様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　７ 年　 ３ 月 ２４ 日現在

機関番号：１１３０１
研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）
研究期間：2019～2022
課題番号：１９ＫＫ０２２３

研究課題名（和文）心臓死ドナー肺をターゲットとした体外肺灌流装置を用いた肺機能回復法の開発

研究課題名（英文）Development of novel method to protect lung function using an extracorporeal lung perfusion device targeting lungs from donetion after circulatory death donors.

研究代表者
新井川　弘道（Niikawa, Hiromichi）

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：８０６３６０２７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　14,200,000円

研究成果の概要（和文）：本課題は、外科処置なしに心停止ドナー肺を速やかに冷却するプロトコルの確立を目的とした。冷温槽を用いてドナー全身を冷媒に浸すことで肺の冷却が可能との仮説を立て、特殊冷媒を用いた冷温槽による新規開発システムにより、心停止後90分で気道温を37℃から28℃まで下げることが可能になった。この為、冷却されない心停止ドナー肺をコントロール(n = 5)とし、冷却群の肺(n = 5)を2時間のex vivo lung perfusion (EVLP)を用いて肺機能評価をしたところ、コントロール群の全ての肺は移植不適とされたのに対し、冷却群では全ての肺が移植可能と判断された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
心停止ドナー肺の機能を維持する有効な方法として、外科処置を必要としない冷温槽を用いた新規冷却方法を提案し、動物実験を通してその有効性を確認することができた。今後、積極的な心停止ドナー肺を用いた肺移植の増加に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to establish a protocol for rapid cooling of donor lungs from donation after circulatory death donors without surgical interventions. We hypothesized that it would be possible to cool the lungs by immersing the entire donor body in a refrigerant using a cold basin. By combining a cold basin using a special cryogenic refrigerant and a refrigerant circulation system, we were able to reduce the tracheal temperature from 37°C to 28°C within 90 minutes after cardiac arrest. Therefore, we evaluated lung function by 2 hours of ex vivo lung perfusion (EVLP) using uncooled donor lungs as controls (n = 5) and lungs from the cooled group (n = 5). All lungs in the cooled group were deemed suitable for transplantation.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：心臓死ドナー　体外肺灌流　温虚血時間

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

肺移植は、重症肺疾患患者に対する最終かつ決定的な治療法であるが、ドナー数とレシピエント数の不均衡による移植待機中死亡は世界的に深刻な問題である[1]。ドナー肺を増やすためにこれまで、マージナルドナー[2]、心停止ドナー(donation after circulatory death DCD)[3]、生体ドナー[4]、安楽死ドナー[5]からの肺を用いた移植が試みられているが、その中でも DCD ドナーからの肺移植は世界的に増加しており、肺ドナープールの拡大に寄与すると期待されている。一般に DCD ドナーは、マーストリヒト分類において 5 つのカテゴリーに分類されるが[6]、特に心停止の状況により、コントロール DCD（cDCD）とアンコントロール DCD（uDCD）の２つに大きく分類される[7]。現在、DCD 肺の大部分は cDCD 由来であるが[8]、この理由は、基本的に医療施設において予定された状況下でドナーが発生し得るからである。一方、uDCD ドナーは院内外に関係なく突然出現するため、肺移植を事前に予定することは極めて困難である。しかし潜在的なドナー数の多さに関する報告がなされており、cDCD の代替戦略として位置づけられている[9]。Boyarsky らは、米国における uDCD の潜在的なドナーは年間 9828 人いると推定しており[10]、uDCD を新たなドナー肺の供給源とすることは合理的と考えられる。

uDCD ドナーからの肺を使用する際の大きな問題は、ほとんどの症例では病院外で循環停止が生じるために、温虚血時間が長時間になり[11]、移植不適応あるいは移植後のグラフト機能障害につながる可能性があることである。マーストリヒトのカテゴリーI の uDCD ドナーにおける温虚血時間は、院外から始まり、緊急で家族の同意を求め、同意が得られたのち肺の冷却が開始されるまで続く。これら肺摘出前の温虚血に伴う肺機能障害を最小化するために、Steen らは、胸腔にチューブを挿入し胸腔内に肺保存液を循環させ、肺を冷却する局所冷却法を利用した。この方法では、1 時間程度で気管支内温度が 15～20℃まで低下し、肺が摘出されるまでの 5 時間の冷虚血時間中、12℃前後で推移したと報告した[11]。また、局所冷却で管理された肺は、体外肺灌流とその後の肺移植で優れた移植後肺機能を示した。しかし、胸腔チューブ挿入は外科的侵襲を伴う手技であり、その手技に熟練した医師や医療スタッフが必要であり、胸部チームを含むこれら熟練スタッフが直ちに処置できない場合、致命的な遅れを生じる可能性がある。

Von't Hoff の法則によると、臓器温度が 10℃下がると代謝活性が半減するとされる。低体温療法は、重症の神経損傷患者に対して、パッドの使用や冷感液の注入によって臨床的に活用されている。虚血後 1 時間以内に軽度低体温（32-35℃）を導入することで、後遺症を予防・軽減できることが報告されている[12]。

２．研究の目的

本課題では、非侵襲的かつ簡便な方法で uDCD ドナー肺の低代謝率を達成するため、ドナー全身を冷媒で満たした冷温槽に浸すことで肺の冷却が可能との仮説を立て、①ブタ uDCD モデルを用いて、ドナー全身を特殊冷媒で満たされた冷温槽に浸すことで肺の冷却を図る新しい冷却システムを確立すること、を一つ目の目的とした。さらに、この新規冷却システムは、uDCD ドナーの肺の温度を下げ、肺機能を維持するための容易かつ効率的な手段であると仮定し、②体外肺灌流を用いて、新規冷却システムにて冷却された肺が冷却をされない uDCD ドナー肺と比較して肺機能が維持されているかどうか評価することを２つ目の目的とした。

３．研究の方法

（１）ドナー全身を冷却する新しい冷却プロトコル開発のため、ドナーブタの全身を特殊液体冷媒の入った「冷温槽」に沈め、開発したプロトコルに基づき臓器の冷却を促進させた。心停止後よりブタの気道･胸腔･食道内に温度計プローブを挿入し､これら温度の推移を連続で計測した。

（２）研究デザインは Figure 1 に示す通りである。15 匹のブタのうち､5 匹は温虚血のない Sham 群とした。 他の 10 匹のブタは、臨床の uDCD ドナーと同様の状況を模倣して安楽死させた。死亡宣告後、肺を 2 群（DCD 群、cooling 群）に分け、冷却あり、あるいは冷却無しの条件下に 85 分間の温虚血に置いた。その後､ドナー肺を標準的方法で 1L の Perfadex(XVIVO Perfusion Inc., Englewood, CO）にてフラッシュの後、摘出し、300 分の冷保存に供した。その後、ドナー肺は標準的なプロトコルの元、ルンド式 EVLP で 120 分灌流された。肺は、生理学的パラメータ、血液ガス分析、気管支鏡所見で毎時間評価された。各時点で灌流液を採取し、灌流後、肺の数カ所の組織を採取して病理組織学的検査、サイトカイン解析、さらに wet/dry 比の測定を行った。

（大動物の準備）
ブタは平均体重 43.2kg（範囲：40.2-48.6kg）のオスを使用した。キシラジン（2mg/kg）およびケタミン（20mg/kg）により全身麻酔が施行され、気管内挿管の後、人工呼吸換気を開始した。

イソフルランは1.5～3.0％を維持した。DCD群およびcooling群では、ヘパリン（500単位/kg）を静脈内投与し、3 分後に塩化カリウムの静脈内投与（2.0mEq/kg）にて安楽死させた。心停止を確認後、換気を停止し、気管カニューレを大気解放した。その後、気管カニューレを介して気管分岐部に温度計プローブを留置し、気道内温度を連続モニターした。灌流液のために専用の献血ブタより全血を入手し、血液はテルモ血液バッグ（テルモ株式会社、東京、日本）にて4℃で保存し、使用直前にセルセーバー（XTRA、Rivanova Japan株式会社、東京、日本）を用いて洗浄した。

（新規ドナー冷却システム）
心停止を確認後、cooling群のドナーブタを冷温槽に入れた。温虚血10分後に、特殊冷媒に浸漬した。その後、開発したプロトコル下に冷却を行い、85 分経過後にブタを冷温槽から手術台に移し、室温で仰臥位とした。温虚血90分にて開胸が開始され、肺が摘出された。

（ブタ肺の摘出）
ドナー肺は、これまで我々のグループからの報告にあるように標準的な方法で摘出された[13]。簡潔な手順として、肺は4℃のPerfadex 1Lで肺動脈に留置されたカニューラより灌流し、肺を摘出した後、EVLP前にPerfadexの4℃で300分間保存した。これまでの我々のDCDドナー肺の評価研究から、85分の温虚血と300分の冷虚血の組み合わせは、120分のルンド式EVLPを施行した際に、中等度の虚血再灌流障害を引き起こすことが明らかになっている。

（EVLP）
EVLPはLund式プロトコールに従って行われた。EVLP回路は、チャンバー、血液ポンプ、人工肺､白血球フィルターで構成され､回路は2LのSteen液､ヘパリン10,000IU､イミペネム100mg、および専用の献血ブタから事前に入手した 500mL の赤血球で満たされた。回路内の空気を除去した後、肺動脈カニューレを回路に接続し、EVLP を開始した。左心房は開いたままとした。灌流開始直後の10分間は、肺動脈カニューレとチャンバー間のシャントを開き、流量を1.0L/minに維持した。10分後、流量を0.2L/minに減らしシャントを閉じた。肺は、灌流の温度を上げることにより、徐々に37℃まで再加温し、45分後に70mL/min/kg（推定心拍出量の100%）の目標流量まで段階的に流量を増加させた。肺温が32℃に達した時点で、人工呼吸器（ART-300、アコマ医科工業株式会社、東京、日本）を用いて、一回換気量(TV) 4mL/kg、呼吸数（RR）7 回/分、呼気終末陽圧（PEEP）5cm H2O、吸入酸素分率（FiO_2）0.4の容量制御式換気を開始した。 肺の温度が36℃に達した時点で､TVを6mL/kgまで漸増し､肺胞リクルートメント操作(TV 10mL/kg、RR 10回/分、PEEP 5cm H2O 、FiO2 0.4 10分間）後、灌流開始から1時間および2時間の時点で肺動脈および左房から血液ガス分析用に灌流液が採取された。

４．研究成果

（１）気管温度
DCD群の気管温度は温虚血中ほぼ一定であったが、一方でcooling群の気管温度は温虚血中に徐々に低下し、85分後に28.5℃に達した（Figure 3A)。

（２）EVLPパラメータ
２時間のEVLP後、cooling群とsham群では全例、肺は移植可能と判断された（Figure 3A)。一方、DCD群では全例の肺が移植不可と判定された。cooling群のPaO2/FiO2比はDCD群より有意に高かったが（412±82 vs. 261±71mmHg, $p < 0.05$)、cooling群とSham群の間に有意差は認められなかった（412±82 vs. 513±85mmHg, $p = 0.11$, Figure 3B)。cooling群の最大吸気圧はDCD群より有意に低いものの（13±2 vs. 19±4 cmH2O $p < 0.01$)、cooling群とSham群の間に有意差は認められなかった（13±2 vs. 10±1mmHg、$p = 0.233$, Figure 3C)。cooling群のシャント比はDCD群より有意に低いが（27.3±9.1 vs. 45.2±8.7%, $p < 0.05$)、cooling群とSham群の間に有意な差は認めなかった（27.3±9.1 vs. 16.5±10.5%, $p = 0.185$, Figure 3D)。追加パラメータとして､cooling群の肺重量比はDCD群より有意に低かったものの(109±15 vs. 166±35%, $p < 0.01$)、cooling群とSham群の間に有意差はみられなかった（109±15 vs. 166±35, $p = 0.872$, Figure 3E)。cooling群のWet/dry比はDCD群より有意に低いが（5.35±0.32 vs. 6.29±0.25, $p < 0.01$)、cooling群とSham群の間にも有意差が認められた（5.35±0.32 vs. 4.87±0.16, $p < 0.05$, Figure 3F)。

以上の結果より、特殊冷媒を用いた冷温槽による新規開発冷却システムにより、心停止後 90分にて気道内温度を 37℃から 28.5℃まで下げることが可能になった。引き続く EVLP を用いた肺機能の再評価では、DCD群の全ての肺が移植不適と判断されたのに対し、cooling群では全てが移植可能と判断された。
心停止ドナー肺の機能を維持する有効な方法として、外科処置を必要としない冷温槽を用い

た新規冷却システムを提案し、大動物実験を通してその有効性を確認することができた。今後、同冷却プロトコルの活用により、積極的な心停止ドナー肺の利用と、それに引き続く心停止ドナー肺を用いた肺移植の増加に貢献するものと考えられる。

<引用文献>

1. Valapour M, Lehr CJ, Skeans MA, et al.: OPTN/SRTR 2020 Annual Data Report: Lung. Am J Transplant 2022;22 Suppl 2:438-518.
2. Okamoto T, Omara M, Ahmad U, et al.: Utilization of Marginal Lung Donors With Low PaO 2 /FiO 2 Ratio and High Body Mass Index. Ann Thorac Surg 2020;109:1663-9.
3. Krutsinger D, Reed RM, Blevins A, et al.: Lung transplantation from donation after cardiocirculatory death: a systematic review and meta-analysis. J Heart Lung Transplant 2015;34:675-84.
4. Date H, Aoe M, Nagahiro I, et al.: Living-donor lobar lung transplantation for various lung diseases. J Thorac Cardiovasc Surg 2003;126:476-81.
5. Ceulemans LJ, Vanluyten C, Monbaliu D, et al.: Lung transplant outcome following donation after euthanasia. J Heart Lung Transplant 2022;41:745-54.
6. Kootstra G, Daemen JH, Oomen AP: Categories of non-heart-beating donors. Transplant Proc 1995;27:2893-4.
7. Thuong M, Ruiz A, Evrard P, et al.: New classification of donation after circulatory death donors definitions and terminology. Transpl Int 2016;29:749-59.
8. Van Raemdonck D, Keshavjee S, Levvey B, et al.: Donation after circulatory death in lung transplantation-five-year follow-up from ISHLT Registry. J Heart Lung Transplant 2019;38:1235-45.
9. Egan TM, Wall S, Goldfrank L, Requard JJ: The real number of organs from uncontrolled donation after circulatory determination of death donors. Am J Transplant 2020.
10. Boyarsky BJ, Jackson KR, Kernodle AB, et al.: Estimating the potential pool of uncontrolled DCD donors in the United States. Am J Transplant 2020;20:2842-6.
11. Steen S, Liao Q, Wierup PN, Bolys R, Pierre L, Sjoberg T: Transplantation of lungs from non-heart-beating donors after functional assessment ex vivo. Ann Thorac Surg 2003;76:244-52; discussion 52.
12. Polderman KH: Application of therapeutic hypothermia in the ICU: opportunities and pitfalls of a promising treatment modality. Part 1: Indications and evidence. Intensive Care Med 2004;30:556-75.
13. Sakota D, Kosaka R, Niikawa H, et al.: Optical oxygen saturation imaging in cellular ex vivo lung perfusion to assess lobular pulmonary function. Biomed Opt Express 2022;13:328-43.

Figure 1.

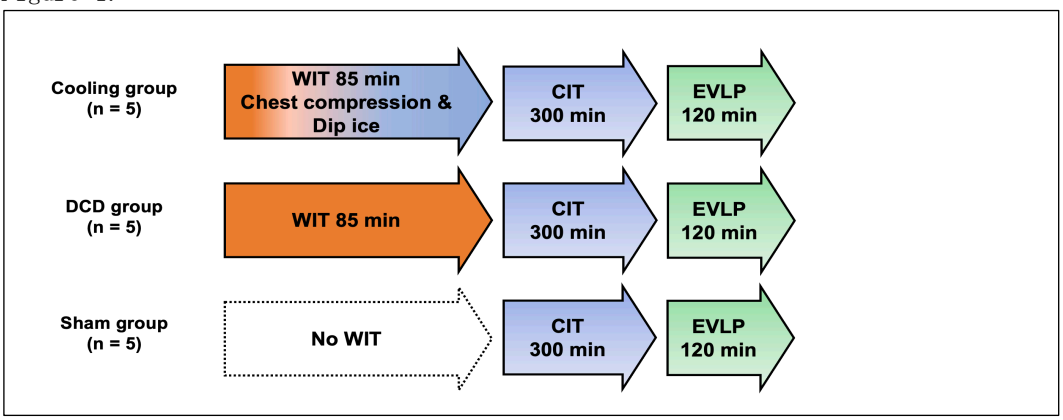


Figure 2.

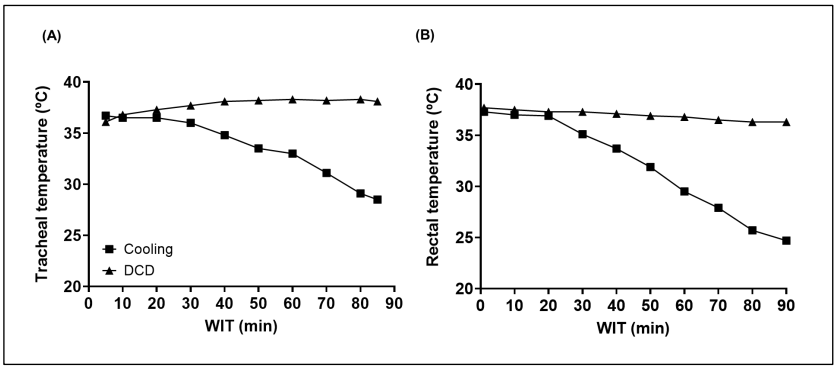
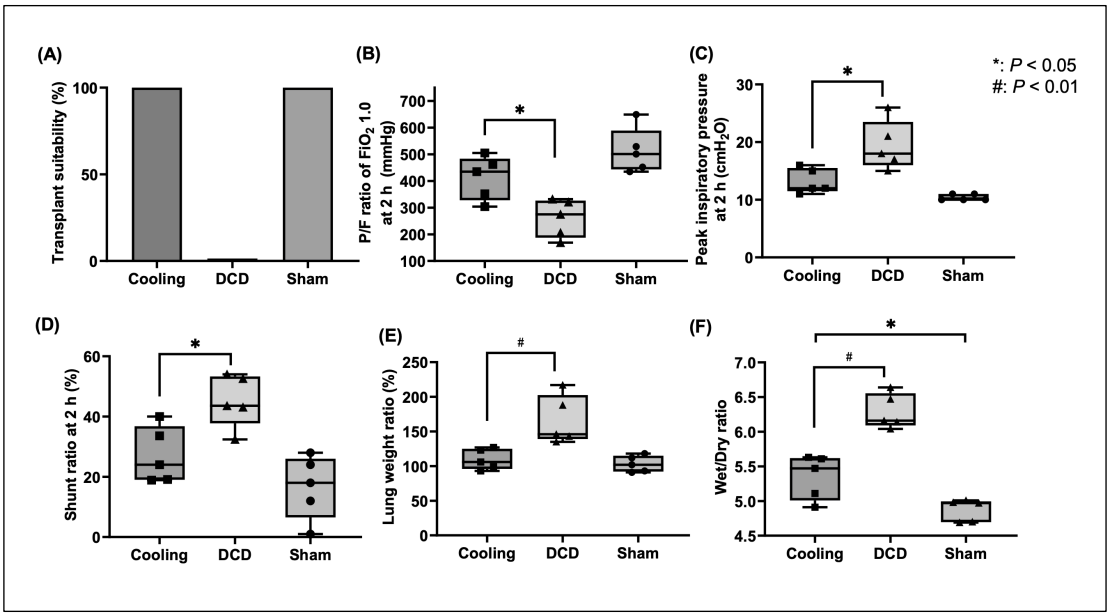


Figure 3.



５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計1件（うち招待講演　0件／うち国際学会　1件）

１．発表者名 Hiromichi Niikawa
２．発表標題 A NOVEL WHOLE-BODY COOLING SYSTEM PROTECTS DONOR LUNGS FROM ISCHEMIA REPERFUSION INJURY:TARGETING UNCONTROLLED DONATION AFTER CIRCULATORY DEATH DONORS
３．学会等名 ESOT Congress 2023（国際学会）
４．発表年 2023年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

―

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	迫田　大輔 (Sakota Daisuke) (40588670)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員 (82626)	
研究分担者	岡田　克典 (Okada Yoshinori) (90323104)	東北大学・加齢医学研究所・教授 (11301)	
研究分担者	渡辺　有為 (Watanabe Yui) (20724199)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	
研究分担者	田中　遼太 (Tanaka Ryota) (40647450)	東北大学・大学病院・特任助手 (11301)	

６．研究組織（つづき）

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究協力者	小阪　亮 (Kosaka Ryo)		

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Cleveland Clinic			